

**ÜBER DEN
GLYKOGENSTOFFWECHSEL
DER LEBER UND
DES DOTTERSACKES
BEIM HÜHNEREMBRYO**

Manfred Schmidt

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. J. Wittmann

ÜBER DEN GLYKOGENSTOFFWECHSEL
DER LEBER UND DES DOTTERSACKS
BEIM HÜHNEREMBRYO

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Manfred Schmidt
aus
Neumarkt

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. J. Wittmann

Korreferent: Prof. Dr. H. Waibl

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Allgemeiner Teil	1
1.1. Embryonale Glucoseverwertung	1
1.2. Regulation des Glykogenstoffwechsels	3
1.3. Die Bedeutung der Glykogenolyse im Stoffwechsel- geschehen	7
1.4. Ziel	11
2. Eigene Untersuchungen	12
2.1. Material und Methoden	12
2.1.1. Reagentien	12
2.1.2. Versuchstiere	12
2.1.3. Applikation von Dexamethason	13
2.1.4. Technik der Begasung	13
2.1.5. Aufbereitung der Leberzellen	14
2.1.6. Herstellung des Leberhomogenates	16
2.1.7. Aufbereitung der Dottersackmembran	17
2.1.8. Statistische Berechnung	18
2.2. Ergebnisse	19
2.2.1. Veränderungen der Glykogen-, Glucose- und Lactatkonzentration in der Leber	19
2.2.2. Einfluß der Adenosinphosphate auf die Glykogenolyse	19
2.2.3. Einfluß des Phosphat-Puffers auf die Glykogenolyse	26

2.2.4.	Veränderungen der Glykogen-, Glucose- und Lactatkonzentration in der Dottersackmembran	28
2.2.5.	Aktivitäten der Glucose-6-Phosphatase und Phosphofructokinase	31
2.2.6.	Einfluß des Calciummangels auf die Glykogenolyse	31
2.2.7.	Zusammenhang zwischen Glykogenolyse und Harnsäurebildung	36
3.	Diskussion	42
4.	Zusammenfassung	50
5.	Literatur	54

1. Allgemeiner Teil

=====

1.1. Embryonale Glucoseverwertung

Ähnlich wie beim erwachsenen Organismus, kommt auch bei dem sich entwickelnden Embryo der Glucose eine zentrale Bedeutung im Energiestoffwechsel zu. Eine ungestörte embryonale Entwicklung setzt eine ausreichende Bereitstellung von Glucose voraus.

Beim Säugerembryo wird dies durch den engen Kontakt des Blutkreislaufes zum Muttertier gewährleistet. Eine endogene Versorgung ist daher nicht erforderlich.

Beim Vogelembryo ist ein derartiges Zusammenwirken von Muttertier und Embryo nicht gegeben.

Die Versorgung des heranwachsenden Embryos erfolgt ausschließlich aus den Eivorräten. Diese enthalten überwiegend Lipide und Proteine, jedoch kaum Kohlenhydrate (33).

Auch wenn beim Vogel der Energiestoffwechsel überwiegend von den Lipiden gespeist wird, ist zudem eine entsprechende Versorgung mit Kohlenhydraten erforderlich. Darauf weisen ganz eindeutige Befunde von SPRATT (38) hin, denen zufolge bei einem verringerten Kohlenhydratangebot die Embryogenese gestört ist. Die ihm aus den Eivorräten zur Verfügung stehenden Kohlenhydrate werden beim Huhn schon innerhalb der ersten Woche der Embryogenese aufgebraucht (18). Die weitere Versorgung mit Kohlenhydraten erfolgt dann über einen endogenen Prozeß, nämlich über die Gluconeogenese. Im Gegensatz zu den Embryonen der meisten Säuger bildet der Vogel den gluconeogenetischen

Stoffwechsel schon in der pränatalen Phase, beginnend ab dem 1. Drittel der Entwicklung, aus (3, 8, 27).

Im Verlauf der Inkubation wird allerdings eine größere Menge an Glucose gebildet als wieder verbraucht wird. Es kommt daher zu einer Anreicherung von Glucose, die in Form von Glykogen gespeichert wird. Als Speicherorgan dient vor allem die Leber und die Dottersackmembran (1).

Beim Säuger werden die Glykogenvorräte in der perinatalen Phase abgebaut, beim Vogel hingegen setzt die Glykogenolyse noch in der pränatalen Phase ein. Beim Hühnerembryo erfolgt dies ca. 3 Tage vor dem Schlupf (12).

Das Ziel, dem die vorzeitige Auslösung der Glykogenolyse dient, ist letztlich nicht bekannt. Eine Vorstellung geht davon aus, daß hierdurch die Gehirnentwicklung beschleunigt und damit die selbständige Durchführung des Schlupfes durch den Embryo unterstützt wird (13).

Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß beim Vogel auch andere Parameter, die beim Prozesse mit dem Schlupfgeschehen in Zusammenhang stehen, schon sehr frühzeitig eingeleitet werden. So beginnt beim Hühnerembryo die Lungenatmung schon um den 19. Tag der Inkubation, also ca. zwei Tage vor dem Schlupf aus dem Ei.

Beim Säuger setzt die Lungenatmung bekanntlich erst in der perinatalen Phase ein. Das Reißen der Nabelschnur, das zur Unterbindung des Gasaustausches führt, ist dabei der entscheidende Stimulus.

Beim Vogel ist die Atmungsentwicklung ein langsam fortschreitender Prozeß. So können beim Hühnerembryo 24 Stunden bis zur

vollständigen Entwicklung der Atemtätigkeit verstreichen (53). Diese relativ lange Phase der Atmungsentwicklung über die Lunge ist deswegen möglich, weil die "Chorioallantois-Atmung" auch nach dem Einsetzen der Lungenatmung noch funktionsfähig bleibt, so daß auch ein Gasaustausch über die Chorioallantois-Membran bei beginnender Lungenatmung noch gewährleistet ist. Dennoch durchläuft auch der Vogelembryo um die Zeit der Atmungs-entwicklung eine hypoxische Phase (49, 50); diese bildet sich im Verlauf mehrerer Tage aus. Sie kommt dadurch zustande, daß der heranwachsende Embryo zunehmend mehr Sauerstoff verbraucht, gegen Ende der Inkubation diesem Anstieg aber die limitierende Gasaustauschkapazität der Eischale entgegensteht. Daraus resultiert letztlich eine Unterversorgung mit Sauerstoff.

Es ist die Vermutung naheliegend (35, 56), daß die Ausbildung der Hypoxie sich auf die Auslösung der Glykogenolyse stimulierend auswirkt, da bekanntlich im Sauerstoffmangel rasch die Glykogenreserven mobilisiert werden. Der dabei ablaufende Mechanismus wird im folgenden dargestellt.

1.2. Regulation des Glykogenstoffwechsels

Die Regulation der Glykogenolyse vollzieht sich in vielschichtiger Weise. Es gibt deutliche Hinweise, daß Glykogenauf- und -abbau in der Zelle gleichzeitig ablaufen; Nettoeffekte kommen demnach durch Verschieben des jeweiligen Gleichgewichtsstatus zustande (15, 21, 40, 51).

Als das vorherrschende Enzymsystem, über das diese Gleichgewichtsverschiebung eingeleitet wird, ist einmal die Glykogen-

Phosphorylase beim Abbau des Glykogens und die Glykogen-Synthetase, die den Glykogenaufbau katalysiert, anzusehen.

Bemerkenswert ist, daß es sich bei beiden Enzymen um interkonvertierbare Katalysatoren handelt und daß Effektoren, die hemmend auf das Phosphorylase-System eingreifen, gleichzeitig das Synthetase-System aktivieren und umgekehrt.

Die Phosphorylase existiert in der Leber wie auch in der Muskulatur in zwei Formen, nämlich der Phosphorylase a und Phosphorylase b. Sie werden zuweilen auch als aktive bzw. inaktive Form bezeichnet, eine Nomenklatur, die die Verhältnisse nicht korrekt wiedergibt, da auch die sogenannte inaktive Form katalytische Kapazität entfaltet. Diese Nomenklatur geht auf die Beobachtung zurück, daß die Phosphorylase b in die aktivere a-Form übergeführt werden kann und diese unter in vivo-Bedingungen und bei ausreichender O_2 -Versorgung im wesentlichen die hepatische Glykogenolyse bestimmt (39, 42).

Die Aktivität der Phosphorylase wird über ein sehr komplexes Kontrollsystem reguliert, in dessen Mittelpunkt die Phosphorylierung der b-Form durch eine Kinase (Phosphorylase-b-Kinase) und eine Dephosphorylierung der a-Form im Falle der Inaktivierung über eine Phosphatase (Phosphorylase-a-Phosphatase) steht. Aber auch die Aktivitäten dieser beiden Enzyme unterliegen selbst wiederum einer Aktivitätsregulierung durch ein weiteres Enzymsystem. Auch die Glykogen-Synthetase kommt in einer phosphorylierten und einer dephosphorylierten Form vor, die über eine spezifische Phosphatase bzw. Kinase ineinander übergeführt werden, wobei hier im Gegensatz zur Phosphorylase die phosphorylierte Form den inaktiveren Katalysator darstellt.

Die Aktivität der phosphorylierten Synthetase läßt sich, im

Gegensatz zur dephosphorylierten Form, durch unphysiologisch hohe Glucose-6-Phosphat-Konzentrationen ganz erheblich steigern. Diese Eigenschaft geht mit der Dephosphorylierung verloren. Auf Grund dieser Tatsache wird die phosphorylierte Form auch "Synthetase D" (D = dependent) und die dephosphorylierte Form als " Synthetase I" (I = independent) genannt.

Der Tatsache, daß beim Phosphateinbau im Falle der Phosphorylase die aktive Form und im Falle der Synthetase die inaktive Form entsteht, ist letztlich zu verdanken, daß Effektoren aktivierend auf den Glykogenabbau und gleichzeitig hemmend auf die Glykogensynthese wirken. Ein besonders effektiv operierender Modulator der beiden Enzym-Systeme ist das cAMP. Während cAMP über eine Aktivierung der Phosphorylase-Kinase die Phosphorylase b in die effektivere Form der Phosphorylase a überführt, wird auf der anderen Seite die Glykogen-Synthetase I in die Synthetase D transferiert, was einer Abnahme der glykogenetischen Aktivität gleichkommt. Über cAMP entfaltet vor allem Glucagon seine Wirkung auf den Glykogenstoffwechsel.

Auch für die glykogenolytische Wirkung der Katecholamine wurde lange Zeit ein ausschließlicher Mechanismus über cAMP angenommen. Heute neigt man zu der Meinung (12, 36), daß das cyclische Nukleotid mit Sicherheit nicht den alleinigen Auslöser der Glykogenolyse darstellt, wahrscheinlich nicht einmal der bestimmende Regulator ist. Das entscheidende Kriterium für diese Meinung bildet die Beobachtung, daß eine Blockierung der β -Rezeptoren oder cAMP-Bildung keine oder kaum meßbare Veränderungen der glykogenolytischen Aktivität des Adrenalins auslöst, während im Falle einer Hemmung der α -Rezeptoren sich eine Hemmung auf den Glykogenabbau einstellt (9,22,32,36).

Auf Grund dieser Befunde neigt man heute zu der Annahme, daß die Katecholamine über α - und β -Rezeptoren ihre glykogenolytische Wirkung entfalten, wobei die Wirkung β -adrenerger Rezeptoren durch eine Stimulierung über cAMP erfolgt und die Aktivierung der α -adrenergen Rezeptoren durch Ca^{2+} -Ionen zustande kommt.

Die Funktion der Ca^{2+} -Ionen ist in den letzten Jahren vor allem im Zusammenhang mit dem Calmodulin, einem calciumbindenden Protein diskutiert worden. Die Befunde, die in diesem Zusammenhang erhalten wurden, deuten darauf hin, daß Ca^{2+} -Ionen die Phosphorylase-b-Kinase aktivieren. In der gleichen Weise entfalten auch andere α -adrenerge Agonisten wie Vasopressin und Angiotensin II ihre Wirkung (20, 24, 47).

Darüber hinaus gibt es noch eine ganze Reihe von Effektoren, die auf dieser Stufe einwirken. Insbesondere sind es Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels und der Adenosinphosphate. Insgesamt scheint deren Bedeutung unter in vivo-Bedingungen gegenüber der des cAMP und der Ca^{2+} -Ionen unter normalen physiologischen Bedingungen im Hintergrund zu stehen.

Eine gewisse Beachtung verdient jedoch die regulierende Kapazität der Adenosinphosphate unter hypoxischen Zuständen. Die Bedeutung der Adenosinphosphate als Regulatoren wird vor allem aus der Tatsache heraus verständlich, daß der Kohlenhydratstoffwechsel im Dienste der ATP-Produktion steht. Es ist daher auch sinnvoll, daß sich Veränderungen im Energiehaushalt, wie es bei hypoxischen Zuständen der Fall ist, über die Adenosinphosphate auf die Bereitstellung von Glucose auswirken. So leitet ein Abfall des ATP eine Steigerung der Glykogenolyse ein. Diese ist in erster Linie auf den aktivierenden Effekt von ADP und AMP zurückzu-

führen, die sich unter diesen Umständen anreichern.

Die Adenosinphosphate greifen an verschiedenen Stellen regulierend in den Glykogenstoffwechsel ein. So hemmen ATP und ADP sowohl die Phosphorylase a wie auch die Phosphorylase b. Gleichzeitig ist von diesen beiden Substanzen eine Hemmung der Phosphorylase-a-phosphatase bekannt. Auf der anderen Seite wirkt AMP stimulierend auf die genannten 3 Enzyme (26, 43, 44). Bis heute fehlt ein Konzept, in das sich diese zum Teil widersprechenden Effekte einordnen lassen. Man kann davon ausgehen, daß es sich in dem einen oder anderen Fall lediglich um in vitro-Effekte handelt. Es bleibt daher zu klären, inwieweit diesen Effekten tatsächlich eine physiologische Bedeutung zukommt. Die entscheidende regulierende Kapazität scheint unter physiologischen Bedingungen auf der Hemmung der Phosphorylase-a-Phosphatase durch AMP begründet zu sein (6, 26, 41, 43).

Danach beruht die durch Hypoxie eingeleitete Glykogenolyse nicht auf einer direkten Aktivierung der Phosphorylase, sondern auf einer Inaktivierung der Phosphatase. In gleicher Weise wirken auch PO_4^{3-} -Ionen, die ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen ansteigen (19, 26).



1.3. Die Bedeutung der Glykogenolyse im Stoffwechselgeschehen

Die oben aufgezeigte Kaskade der Glykogenolyse setzt dann ein, wenn die Glucoseversorgung unterbunden wird, bzw. wenn ein Sauerstoffmangel die Metabolisierung anderer Energiesubstrate erschwert. Ein derartiger Status ist z.B. beim Säuger in der

perinatalen Phase gegeben. Dabei muß gewährleistet sein, daß die freigesetzte Glucose auch anderen Organen und Zellen zur Verfügung gestellt wird, insbesondere solchen, die auf eine ständige Glucosezufuhr angewiesen sind, wie z.B. Nierenmark, Nervengewebe und Erythrozyten. Es muß also verhindert werden, daß entstehende Glucose in der Leber weiter umgesetzt wird. Dies wird dadurch erreicht, daß das anfallende Glucose-6-Phosphat nicht dem glykolytischen Stoffwechselweg zugeführt wird, sondern durch die Glucose-6-Phosphatase in Glucose übergeführt wird und als solche die Leber verläßt. In diesem Zusammenhang wird der Relation der Aktivitäten der Glucose-6-Phosphatase und der Phosphofructokinase, die als Schrittmacherenzym in der Glykolyse anzusehen ist, eine entscheidende Bedeutung zuerkannt.

Die Frage, ob und in welchem Umfang aus dem Glykogen freigesetzte Glucose auch der Leber zur Verfügung steht, ist in der Literatur wiederholt ausgesprochen worden (48, 58). Eine exakte experimentelle Lösung dieser Problematik begegnet der Schwierigkeit, daß endogenes Glykogen nicht zu 100 % radioaktiv markiert werden kann und dadurch eine quantitative Bearbeitung erschwert ist. Die meisten Untersuchungen begnügen sich daher mit einer Bilanzierung, die sich auf die wichtigsten Metabolite, wie Glucose, Glucose-6-Phosphat und Lactat beschränkt. In der Regel entspricht dann auch der Abfall der Glykogenkonzentration der Zunahme der Glucosekonzentration. Eine nennenswerte Umsetzung der aus dem Glykogen stammenden Glucose in der Leber scheint lediglich unter anaeroben Bedingungen und in Stoffwechselsituationen, in denen eine intensive Fettsynthese abläuft, stattzufinden (7, 19, 58). Im letzteren Falle wird offensichtlich die Acetyl-CoA-Synthese durch die Glykogenolyse und anschließende Glykolyse unterstützt.

Ähnlich wie bei der Glykogenolyse existiert auch bei der Gluconeogenese das vordringliche Problem, die gebildete Glucose dem Organismus zuzuführen. Auch hier wird die Entscheidung auf der Stufe der Glucose-6-Phosphatase und der Phosphofructokinase getroffen.

Es überrascht daher nicht, daß beide Stoffwechselwege, nämlich die Glykogenolyse und die Gluconeogenese oft gleichzeitig aktiviert bzw. inaktiviert werden. Beispielhaft seien hier die diesbezüglichen Wirkungen von Adrenalin, Insulin und Glucagon genannt. Interessanterweise steht bei der Regulierung der Gluconeogenese nicht wie bei der Glykogenolyse das cAMP im Vordergrund.

Im wesentlichen sind es Metaboliten der Adenosinphosphate, die den katabolen Glucosestoffwechsel in den anabolen Status umpolen und vice versa. Die Regulation vollzieht sich hauptsächlich auf der Stufe von limitierenden Reaktionsschritten, wie z.B. Pyruvatcarboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Fructose-Diphosphatase beim gluconeogenetischen Stoffwechselweg und auf der Stufe der Phosphofructokinase, Pyruvatkinase und Pyruvat-Dehydrogenase in der glykolytischen Reaktionsfolge. Dabei wird durch ATP die Glykolyse auf der Stufe von Fructose-6-Phosphat gehemmt, während energiearme Metabolite wie ADP und AMP sowie PO_4^{3-} -Ionen die Gluconeogenese zugunsten der Glykolyse verschieben.

Die Aktivierung der Fructose-Diphosphatase durch ATP dirigiert damit den Metabolitenfluß in Richtung Glucosesynthese, während das energiearme AMP diesen Schritt hemmt und gleichzeitig die Phosphofructokinase aktiviert. Dadurch wird im energiereichen Stoffwechselstatus die Gluconeogenese favorisiert und im ener-

giearmen Status die Glykolyse und damit die ATP-Bildung intensiviert.

Über die Koordinierung mit dem Glucosestoffwechsel steht der Glykogenstoffwechsel gleichzeitig mit anderen Stoffwechselwegen in Kontakt. So ist nicht überraschend, daß, wie oben erwähnt, der Glykogenabbau in die Lipidsynthese eingreift. Auch der wiederholt angeführten Interaktion zwischen O_2 -Versorgung und Glykogenolyse liegt letztlich ein Einwirken des mitochondrialen Energiestoffwechsels auf die Glykolyse zugrunde.

In diesem Zusammenhang sei abschließend auf die Interaktion zwischen Glucosestoffwechsel und Harnsäurebildung hingewiesen, die besonders augenfällig beim Vogel auftritt.

Eine Zunahme der Gluconeogenese geht mit einer vermehrten Harnsäurebildung einher. FISTER et al. erklären die Koordinierung der Gluconeogenese mit der Harnsäurebildung durch die Tatsache, daß im gluconeogenetischen Status die Pyruvatkinase gehemmt ist. Dadurch steht der Zelle eine vermehrte Glucosemenge zur Verfügung, die sie für die Synthese von Phosphoribosylpyrophosphat einsetzt, einer limitierenden Reaktion in der Purinsynthese. MAPES und KREBS hingegen sehen in der Glutaminsynthese einen entscheidenden Faktor, der sich auf Gluconeogenese wie Harnsäurebildung auswirkt. Durch eine gesteigerte Glutaminbildung verringert sich das Kohlenstoffgerüst, das für die Gluconeogenese und für die Harnsäurebildung eingesetzt wird. Als Folge davon reduzieren sich diese beiden Stoffwechselwege gleichzeitig. Inwieweit davon auch der Glykogenstoffwechsel betroffen ist, ist bis heute nicht geklärt.

1.4. Ziel

Wie im vorausgegangenen Abschnitt dargelegt wurde, erfordert beim Säuger die abrupte Unterbrechung der Versorgung des Embryos durch das Reißen der Nabelschnur eine fast augenblickliche Bereitstellung mit Glucose, die über die Glykogenolyse erfolgt.

Im Gegensatz zum Säuger setzt beim Vogelembrryo die Glykogenolyse bereits in der pränatalen Phase ein. Das Ziel, dem diese Glucosebereitstellung dient, ist bis heute nicht bekannt. Da der Vogelembrryo im Verlauf der pränatalen Entwicklung bereits den Stoffwechselweg der Gluconeogenese ausbildet, wird auf diese Weise die Glucosebereitstellung garantiert. Eine Mobilisierung von Kohlenhydratreserven wäre unter diesem Aspekt nicht erforderlich. Um dieses Phänomen zu klären, wäre eine Kenntnis über den Mechanismus, der die Glykogenolyse einleitet, sehr dienlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb dieser Mechanismus untersucht.

2. Eigene Untersuchungen

=====

2.1. Material und Methoden

2.1.1. Reagentien:

Enzyme, Coenzyme	:	Fa. Boehringer, Mannheim
Harnsäure-Test		
 Kollagenase	:	 Worthington, Amersham, U.K.
 Ficoll-Paque	:	 Pharmacia Fine, Chemicals AG, Uppsala, Sweden
 Flüssiger Stickstoff	:	 Fa. Linde, Lohhof b. München
Carbogen, Stickstoff		
 alle übrigen	:	 Fa. Merck, Darmstadt
Reagentien		

Zur Herstellung der Lösungen wurde, wenn nichts anderes angegeben, Aqua bidest. verwendet.

2.1.2. Versuchstiere:

Als Versuchstiere wurden embryonale und geschlüpfte Küken der Rassen Weißes Leghorn und Bovans verwendet.

Die Eier der weißen Leghornrasse wurden vom Versuchsgut Heinrichsruh, die der Bovans vom Geflügelhof Lohfeld bei Dachau bezogen.

Die Bebrütung erfolgte bei einer Temperatur von 37-38° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 63-68%. Die Haltung der geschlüpften Küken erfolgte in einer temperierten Batterie. Gefüttert wurde mit handelsüblichem Alleinfuttermittel für Küken der Bayerischen Kraftfutter GmbH. Wasser konnte ad libitum aufgenommen werden. Verwendet wurden bebrütete Eier ab dem 17. Tag und geschlüpfte Küken bis zum 3. Tag.

2.1.3. Applikation von Dexamethason

Um eine einheitliche Resorption zu erreichen, wurde die Substanz in die Luftkammern injiziert. Zu diesem Zweck wurde mit einer sterilen Kanüle die Eischale über der Luftkammer durchstoßen und die auf 37° C temperierte Lösung von 0,1 ml Dexamethason eingebracht, was einer Konzentration von 0,125 mg/Ei entspricht. Nach der Applikation wurden die Eier senkrecht, mit der Luftkammer nach oben gelagert und die Perforationsstelle mit Wachs verschlossen. Zur besseren Resorption wurden die so behandelten Eier für 2 Stunden senkrecht in den Brüter gestellt.

2.1.4. Technik der Begasung

Zur Herstellung eines anoxischen Zustandes wurde in das Inkubationsgefäß, das die Dottersackmembran enthielt, für die Dauer von 3 Minuten N₂ unter geringem Druck eingeleitet. Danach wurden die 15 ml-Plastikgefäße mit Schraubverschluß verschlossen und anschließend bei 37° C inkubiert.

2.1.5. Aufbereitung der Leberzellen

Um eine weitgehende Ausblutung zu erreichen, wurden die Embryonen dekapitiert. Die frisch entnommenen Lebern von mehreren Tieren wurden nach sorgfältiger Entfernung der Gallenblasen in eisgekühltem, zuvor 10 Minuten mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begasten Krebs-Puffer gegeben. Danach erfolgte die Herstellung der Leberzellsuspension nach der von WITTMANN et al. (55) beschriebenen Methode.

Nach Zerkleinerung mit der Schere auf Stücke von Reiskorngröße erfolgte eine zweimalige Spülung mit dem Krebs-Puffer. Nach Dekantierung der Spülflüssigkeit wurde die zerkleinerte Leber in ein feinmaschiges Kunststoffsieb gegeben und mit einem Pistill durch das Sieb gedrückt. Die derartig zerkleinerte Lebermasse wurde in einem darunter stehenden Gefäß mit 10 ml Krebs-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10 mg Kollagenase (Aktivität: 151 E) wurde die Lebersuspension in eine Kunststoffflasche gegossen und im Wasserbad bei 37° C 30 Minuten langsam geschüttelt. Danach wurde die Kollagenase mit 10 ml eisgekühltem Krebs-Puffer inaktiviert. Nach Überführung der Suspension in ein großes Zentrifugenglas, in dem die Abtrennung grober Bestandteile durch Sedimentierung erfolgte, wurde der Überstand auf 2 kleinere Zentrifugengläser verteilt und 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Die auf diese Weise gewonnenen Niederschläge wurden nach Dekantierung des Überstandes mit je 0,5 ml Krebs-Puffer versetzt, aufgerührt und in einem graduierten Zentrifugenglas vereinigt. Zur Abtrennung der Erythrozyten wurde mit 3 ml Ficoll überschichtet und bei 2000 x g 5 Minuten zentrifugiert. Der die Leberzellen enthaltende Überstand wurde

durch Dekantieren in 3 ml Krebs-Puffer übergeführt und durch dreimaliges Zentrifugieren, Dekantieren und Suspendieren im frischen Krebs-Puffer gewaschen. Nach der letzten Waschung wurde der Niederschlag in 1 ml Krebs-Puffer aufgenommen und zur Inkubation eingesetzt. Nur etwa 1% der Leberzellen, die nach der beschriebenen Methode gewonnen worden waren, ließen sich mit 1%iger Trypanblau-Lösung anfärben, was auf eine weitgehende Unversehrtheit der Zellmembranen hindeutet. Die Messung der Lactat-Dehydrogenase im Medium (4), die auf Zellmembranschädigungen sensibler reagiert als die Trypanblau-Färbung, zeigte eine Schädigung von etwa 20% an.

Da Glutamatdehydrogenase (28) in meßbarer Konzentration nicht vorhanden war, konnte davon ausgegangen werden, daß die Mitochondrien unbeschädigt waren.

Im WARBURG-Apparat verbrauchte 1 mg Leberzellen 1.52 $\mu\text{Mol O}_2/\text{min}$.

Zur Inkubation wurden 100 μl der suspendierten Leberzellen in 15 ml-Plastikgefäße gegeben und das Volumen mit Krebs-Puffer auf 1 ml ergänzt. Die Inkubation erfolgte im Schüttelbad bei 37° C für die Dauer von 30 Minuten. Danach wurden die Reaktionen durch Zugabe von 50 μl 50%iger Trichloressigsäure gestoppt. Zur Bestimmung des Ausgangszustandes wurde der Ansatz zum Zeitpunkt 0 gestoppt. Die auf diese Art behandelten Reaktionsansätze wurden in EPPENDORF-Cups pipettiert und in einer Tischzentrifuge (EPPENDORF 3200) bei 1000 x g 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Pipette entnommen und nach Zugabe von 10 μl Methylorange (Indikator) mit Kaliumhydrogencarbonat neutralisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der auf diese Weise gewonnene Überstand zur Bestimmung von Glucose, Glykogen

und Lactat verwendet (5, 25, 31).

Die Messung des ATP-Gehaltes erfolgte nach der von JAWOREK beschriebenen Methode (23).

2.1.6. Herstellung des Leberhomogenates

Die frisch entnommene Leber wurde nach Entfernung der Gallenblase mit der Schere zerkleinert und mehrmals im kalten Krebs-Puffer, der zuvor 10 Minuten mit Carbogen begast worden war, gespült. Nach Abgießen der Spülflüssigkeit wurde die zerkleinerte Leber mit Krebs-Puffer im Volumenverhältnis 1 : 6 verdünnt und mit einem Pistill-Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM zerkleinert. In den Fällen, in denen der Einfluß der Phosphat-Ionen untersucht wurde, wurde anstelle des Krebs-Puffers Phosphat-Puffer (2,5 millimolar), pH 7,4 eingesetzt.

Danach wurden 900 µl Homogenatsuspension mit 100 µl Krebs-Puffer, dem die Adenosinphosphate beigemischt worden waren, versetzt. Die Inkubation erfolgte dann auf die gleiche Weise wie bei den Leberzellen.

Zur ATP-Bestimmung wurden die Lebern innerhalb von 10 Sekunden entnommen und tiefgefroren, um einen schnellen ATP-Abbau zu vermeiden (52). Dazu diente eine in flüssigem Stickstoff vorgekühlte Gefrierstopzange nach WOLLENBERGER und BÜCHER. Das Gewebe wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert. Ein Gramm der pulverisierten Leber wurde in 4 ml einer Lösung von 6%iger Perchlorsäure aufgenommen und mit dem Ultraturrax (TP 18/2 Janke & Kunkel) 30 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 15000 x g und 4° C 15 Min.

zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und im Eisbad aufbewahrt. Der Niederschlag wurde in 4 ml 3%iger Perchlorsäure suspendiert und nochmals zentrifugiert. Danach wurden beide Überstände vereint, mit Kaliumcarbonat auf pH 3.5 eingestellt, und davon ATP nach der von JAWOREK et al. (23) beschriebenen Methode bestimmt.

Die Bestimmung von Glucose, Glykogen und Lactat erfolgte wie bei den Leberzellen.

Glykogen wurde auf der Glucose-Basis berechnet.

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase wurde nach der von BAGINSKI et al. beschriebenen Methode (2), die der Phosphofructokinase nach der Beschreibung von FISTER et al. (10) durchgeführt.

Die Bestimmung der Xanthindehydrogenase erfolgte nach der Methode von SCHOLZ und FEATHERSTON (34).

Die Aktivität der Enzyme ist in Einheiten pro Gramm Gewebe angegeben. Eine Einheit (E) ist die Enzymaktivität, die 1 μ Mol Substrat pro Minute bei 37° C umsetzt.

Die Bestimmung der Harnsäure erfolgte mit Hilfe der fertigen Testkombination Urica-quant[®] der Firma Boehringer, Mannheim.

2.1.7. Aufbereitung der Dottersack-Membran

Zur Metabolitenbestimmung in der Dottersackmembran wurden 0,1 g Dottersack-Membran mit 1 ml Krebs-Puffer bzw. 1 ml Phosphat-Puffer (2,5 millimolar) versetzt. Danach wurde 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 0,3 ml entnommen und mit 30 μ l 30%iger Perchlorsäure enteiweißt. Nach der Neutralisation

erfolgte die Messung von Glykogen, Glucose und Lactat nach den bereits beim Leberhomogenat beschriebenen Methoden.

2.1.8. Statistische Berechnung:

Alle in den Tabellen angegebenen Werte sind Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen ($\pm$). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests ermittelt.

2.2. Ergebnisse

2.2.1. Veränderungen der Glykogen-, Glucose- und Lactatkonzentration in der Leber

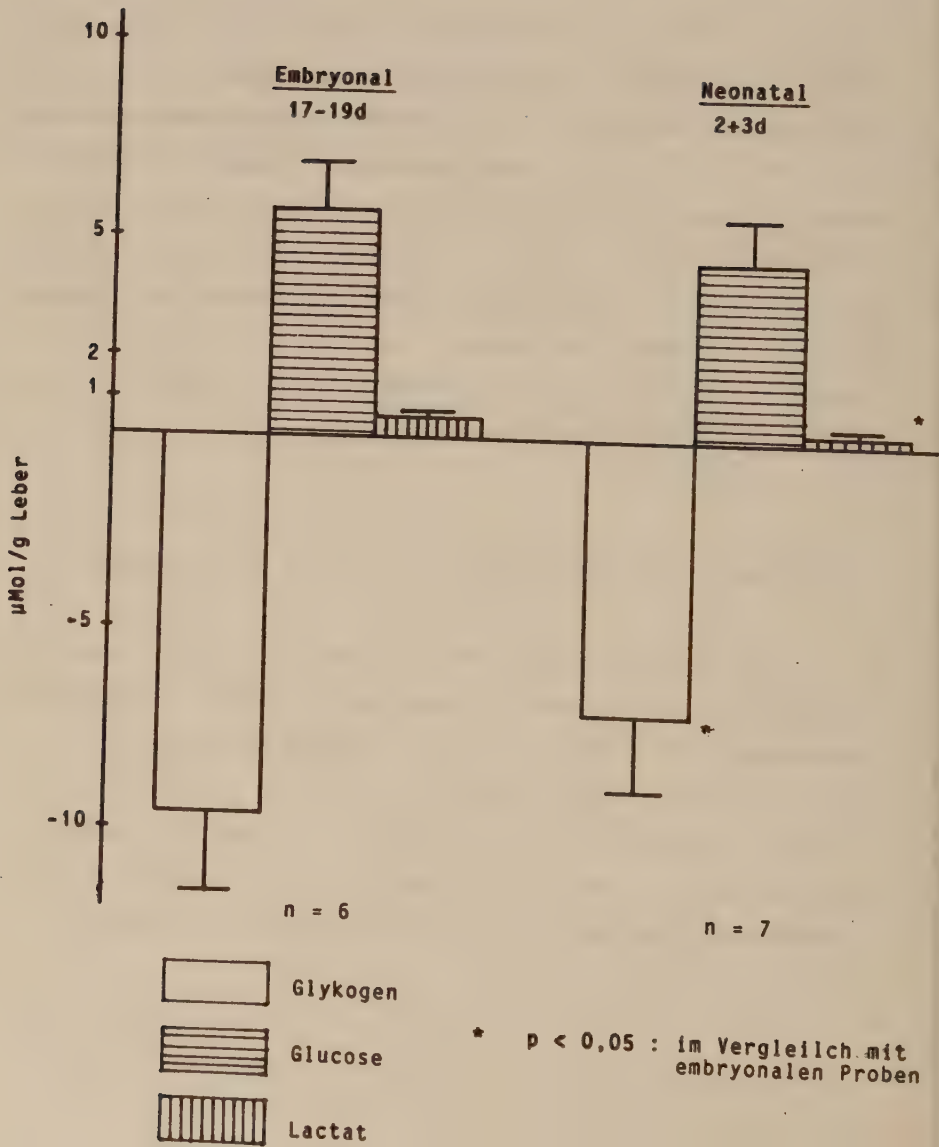
Zunächst wurden die Veränderungen der Lactat-, Glucose- und Glykogenkonzentration des Leberhomogenates im Verlauf einer 30-minütigen Inkubation bestimmt. Wie Abb. 1 zeigt, nimmt sowohl in der prä- wie auch in der neonatalen Phase die Glykogenkonzentration deutlich ab, gleichzeitig erhöht sich die Glucosekonzentration und in einem allerdings wesentlich geringeren Umfang auch die Lactatkonzentration. Die Abnahme des Glykogens entspricht annähernd der Zunahme der Glucose- und Lactatkonzentration. Dabei sind die Veränderungen in der pränatalen Phase deutlicher als in der neonatalen Phase.

2.2.2. Einfluß der Adenosinphosphate auf die Glykogenolyse

Da in der homogenisierten Leber der in vivo-Status weitgehend zerstört ist, wurden vergleichende Untersuchungen an Leberzellen durchgeführt, in denen der in vivo-Status wenigstens in einem gewissen Umfang erhalten bleibt. Auch hier zeigte sich eine deutliche Abnahme der Glykogenkonzentration und eine Zunahme des Glucosespiegels (Tab. 1). Allerdings fällt auf, daß hier die Glucosezunahme stärker ausgeprägt ist als die Glykogenabnahme.

Abb. 1

Abnahme von Glykogen und Zunahme von Glucose und Lactat
in der embryonalen Kückenleber



Tab. 1 Veränderungen im Glucose- u. Glykogengehalt bei isolierten Leberzellen in der prä- und neonatalen Phase

		Dauer der Bebrütung (d)	
		18/19 d	20/21 d
		2/3 d neonatal	
		μ Mol Glucose/g Leberzellen	
Glucose		+ 1.48 ± 0.48	+ 0.54 ± 0.12 ***
n		(8)	(7)
			+ 0.07 ± 0.02 ***
			(6)
Glykogen		- 0.87 ± 0.14	- 0.20 ± 0.06 ***
n		(8)	(7)
			- 0.04 ± 0.01 ***
			(6)

d = Anzahl der Tage
n = Anzahl der Versuche
*** p < 0.001 im Vergleich zu 18/19 d
+ = Zunahme
- = Abnahme

Da der Glykogenstoffwechsel sich in Abhängigkeit des Energiestoffwechsels vollzieht, interessierte in weiteren Untersuchungen der ATP-Gehalt der Leber. Den Werten der Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß in den isolierten Zellen wie auch in der homogenisierten Leber der ATP-Gehalt gegen den Schlupf zu abnimmt.

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, wirkt AMP auf die Glykogenolyse wie auch auf die Glykolyse stimulierend. Im folgenden wurde daher untersucht, ob sich dieser Effekt auch in der embryonalen Kükenleber aufzeigen läßt. Zu diesem Zweck wurde das Leberhomogenat mit 5 millimolarer AMP-Lösung versetzt. Dabei zeigte sich, daß AMP weder die Glucose- noch die Lactatkonzentration erhöhte (Tab. 3).

Nachdem AMP keine besondere Auswirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel zur Folge hatte, stellte sich die Frage, ob durch Anreicherung von ATP die Glykogenolyse beeinflusst wird. Nachfolgend wurde das Leberhomogenat mit ATP versetzt und die Veränderungen im Glucosegehalt registriert.

Die Zufuhr von ATP hatte in der prä- wie auch in der neonatalen Phase eine deutliche Steigerung der Glucose zur Folge (Tab. 4). Ein geringer ausgeprägter Effekt war nach Gaben von ADP zu beobachten.

Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als mit dem ATP aufgrund seiner stimulierenden Wirkung auf die Glykogen-Synthetase und seiner hemmenden Wirkung auf die Glykogen-Phosphorylase eine gesteigerte Glykogenese zu erwarten gewesen wäre.

Da unter den gegebenen Inkubationsbedingungen mit einem ATP-Abbau gerechnet werden muß, wurde anschließend der Verlauf der ATP-

Tab. 2 ATP-Gehalt der Leberzellen und des Leberhomogenats von Hühnerembryonen

		Dauer der Bebrütung (d)		
		17	18	19
		20/21		
		μ Mol/g Leber		
Leberzellen		0.35 ± 0.09	0.24 ± 0.06	0.14 ± 0.05 ***
n		(7)	(7)	(7)
Leberhomogenat		1.73 ± 0.29	1.80 ± 0.36	1.36 ± 0.29 *
n		(8)	(8)	(8)
				1.07 ± 0.15 ***
				(8)

d = Anzahl der Tage
n = Anzahl der Versuche
* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.001
im Vergleich mit 17 d

Tab. 3 Glucose- und Lactatbildung im Krebs-Puffer unter dem Einfluß von AMP

	Kontrolle	AMP
	Zunahme in μ Mol/g Leber	
Embryonal (17 + 18 d)		
Glucose	2.14 ± 0.61	2.69 ± 0.60
n	(6)	(6)
Lactat	0.71 ± 0.28	0.76 ± 0.25
n	(6)	(6)

d = Anzahl der Tage
 n = Anzahl der Versuche
 Konzentration von AMP: 5mMol/ml

Tab.4

Einfluß der Adenosinphosphate auf die Glucosebildung im Krebs-Puffer

	Kontrolle	ATP	ADP
	Zunahme der Glucose in μ Mol/g Leber		
Embryonal (17-19 d)	5.20 $\pm$ 1.05	66.79 $\pm$ 8.01 ***	45.20 $\pm$ 5.17 ***
n	(6)	(6)	(6)
Neonatal (2 + 3 d)	4.51 $\pm$ 0.96	72.49 $\pm$ 8.73 ***	55.10 $\pm$ 6.53 ***
n	(6)	(6)	(6)

d = Anzahl der Tage
 n = Anzahl der Versuche
 Konzentration der Adenosinphosphate: 5mMol/ml
 *** p < 0.001 im Vergleich zur Kontrolle

Konzentration im Homogenat verfolgt. Dabei wurde das Homogenat mit 5 millimolarer ATP-Konzentration versetzt und 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Analyse ergab, daß die dem ATP zugeordnete Extinktion von ca. $\Delta E = 0,240$, die zu Beginn des Versuches gemessen wurde, nach 10 Minuten auf nicht mehr meßbare Extinktionswerte abfiel.

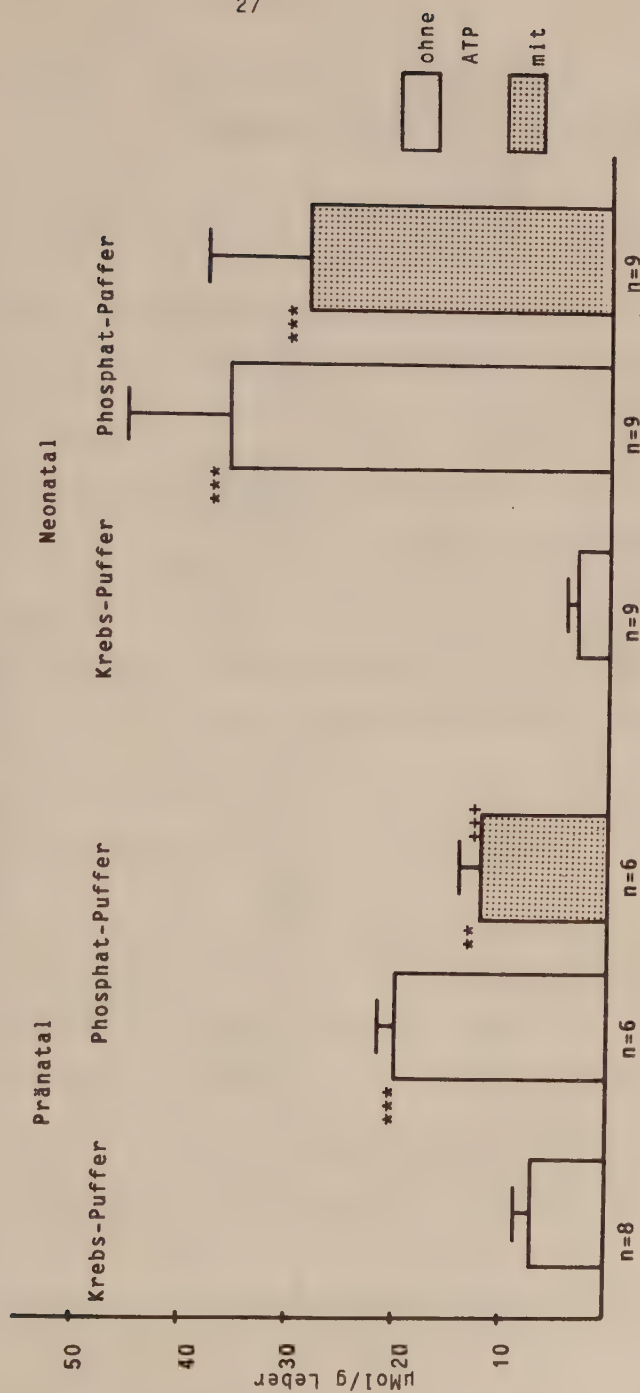
Es ist also mit einem deutlichen Anstieg von anorganischem Phosphat, das beim Abbau von ATP entsteht, zu rechnen.

2.2.3. Einfluß des Phosphat-Puffers auf die Glykogenolyse

In weiteren Versuchen wurde daher der Effekt von PO_4^{3-} -Ionen auf den Kohlenhydratumsatz untersucht. Zu diesem Zweck wurde anstelle des Krebs-Puffers, der eine 1,5 millimolare Phosphat-Konzentration enthält, ein 2,5 millimolarer Phosphat-Puffer eingesetzt. Wie Abb. 2 zeigt, führte der Wechsel des Puffersystems sowohl prä- wie auch neonatal zu einer Steigerung der Glucosekonzentration. Gleichzeitig wurde der Einfluß von ATP im Phosphat-Puffer untersucht. Wie Abb. 2 zeigt, ist auch unter diesen Bedingungen die anfallende Glucose höher als im Krebs-Puffer. Sie erreicht allerdings nicht die Werte, die mit dem Phosphat-Puffer allein registriert wurden.

Abb.2 Einfluß von ATP auf die Glucosebildung im Phosphat-Puffer

Zunahme der Glucose



** p < 0.01 Vergleich von Phosphat-Puffer

*** p < 0.001 mit Krebs-Puffer

+++ p < 0.001 Vergleich von Phosphat-Puffer
mit und ohne ATP

2.2.4. Veränderungen der Glykogen-, Glucose- und Lactatkonzentration in der Dottersackmembran

Im zweiten Abschnitt wurde die Glykogenolyse im Dottersack untersucht. Zu diesem Zweck wurden, wie im Methoden-Teil beschrieben, je 100 mg Dottersackmembran inkubiert und anschließend die entsprechenden Parameter bestimmt.

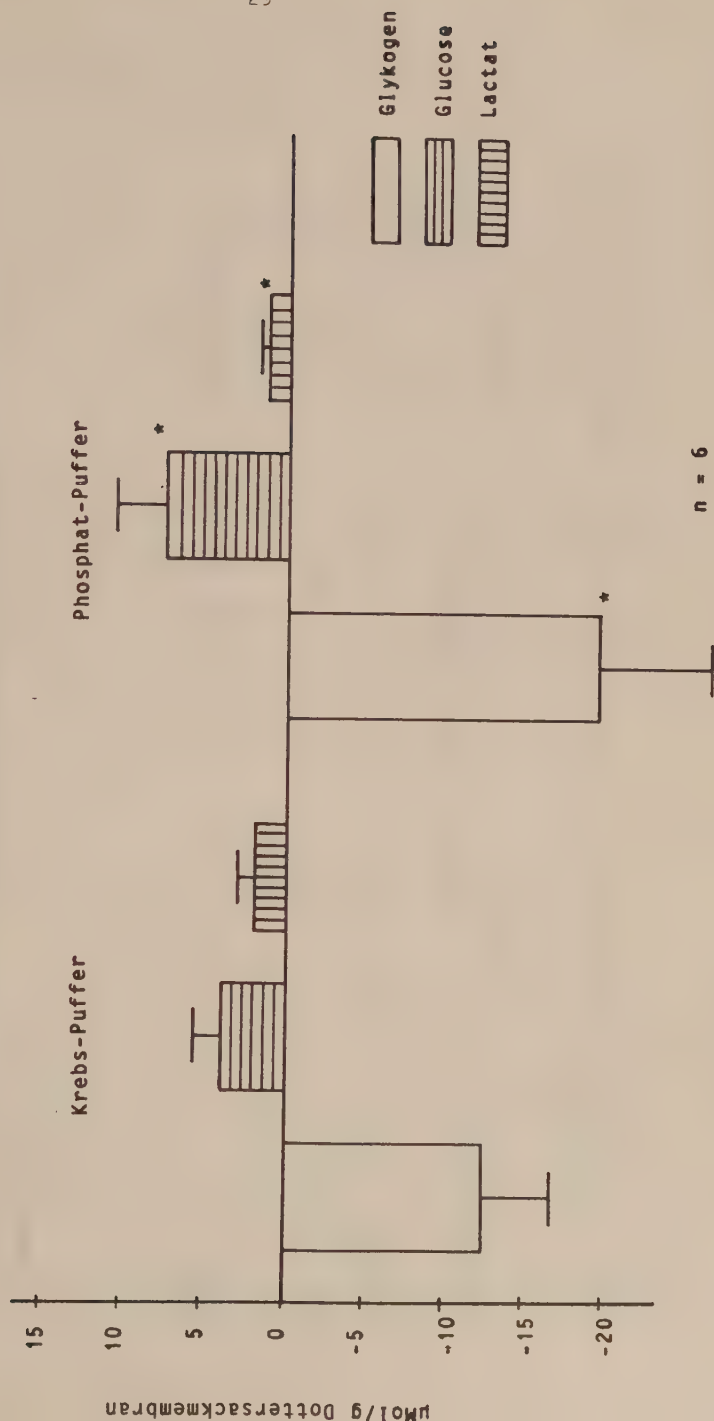
Aus den Werten der Abb. 3 ist zu entnehmen, daß, ähnlich wie in der Leber, auch im Dottersack im Krebs-Puffer und Phosphat-Puffer die Glykogenkonzentration abnimmt und der Glucose- und Lactat-Spiegel zunehmen.

Dabei ist im Falle des Krebs-Puffers die Glucosezunahme bzw. Glykogenabnahme weniger und die Lactatzunahme deutlicher ausgeprägt als beim Phosphat-Puffer. Auffallend ist, daß die Abnahme des Glykogens die Zunahme von Glucose und Lactat übersteigt.

Schließlich ist aus Abb. 3 ersichtlich, daß die Glucosezunahme stärker ausgeprägt ist als die Lactatzunahme.

Anschließend wurde an der Dottersackmembran der Einfluß des Energiestoffwechsels auf die Glykogenolyse untersucht. Dabei wurde die Dottersackmembran einmal unter anaeroben Bedingungen (Begasung mit N_2) und zum anderen in Anwesenheit von Antimycin A, einem Hemmer der mitochondrialen Atmung, untersucht. Wie aus Tab. 7 zu entnehmen ist, erhöht sich unter diesen Bedingungen der Lactat-Spiegel, während die Glucosezunahme erniedrigt ist.

Abb. 3 Einfluß des Puffers auf die Abnahme von Glykogen und die Zunahme von Glucose und Lactat im Dottersack



* $p < 0,05$
im Vergleich zum Krebspuffer

Tab. 7 Einfluß von N_2 und Antimycin A auf die Glucose- und Lactatbildung im Dottersack

	Zunahme in $\mu\text{Mol/g}$ Dottersack	
	Kontrolle	N_2 Antimycin A
Glucose	5.61 ± 0.73	$3.41 \pm 1.11^{**}$ $2.21 \pm 0.38^{***}$
n	(6)	(6)
Lactat	3.84 ± 1.27	$7.96 \pm 0.73^{***}$ $14.02 \pm 2.63^{***}$
n	(6)	(6)

n = Anzahl der Versuche

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

2.2.5. Aktivitäten der Glucose-6-Phosphatase und der Phosphofructokinase

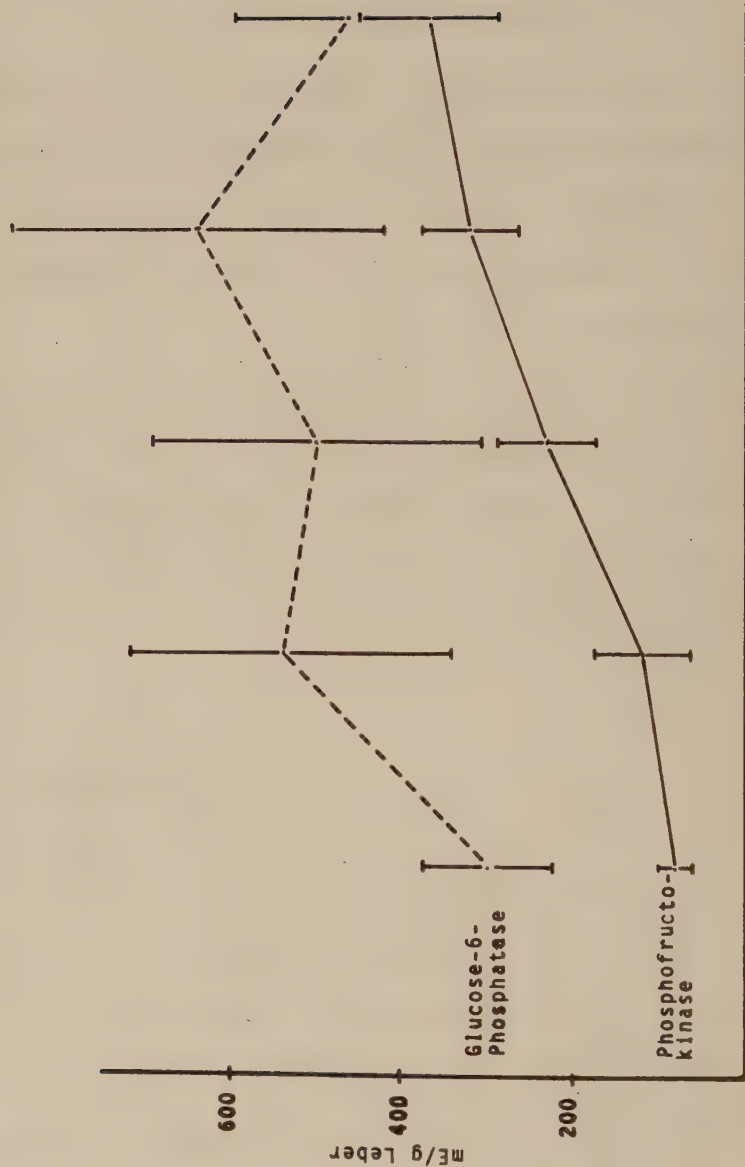
In diesem Zusammenhang interessierten die Aktivitäten der Glucose-6-Phosphatase und Phosphofructokinase der Leber und des Dottersacks, die in den Abb. 4 + 5 gegenübergestellt sind. Es zeigte sich, daß in der Leber und im Dottersack die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase die der Phosphofructokinase bei weitem übersteigt.

Gleichzeitig wurde auch der Einfluß der Adenosinphosphate auf die Phosphofructokinase-Aktivität in der Leber untersucht. Nach Tabelle 5 nimmt beim Übergang von der prä- in die neonatale Phase die Aktivität zu. Exogen zugeführtes ATP führt unabhängig vom Entwicklungsstatus zu einer Hemmung der Aktivierung, während exogenes AMP die Aktivität steigert.

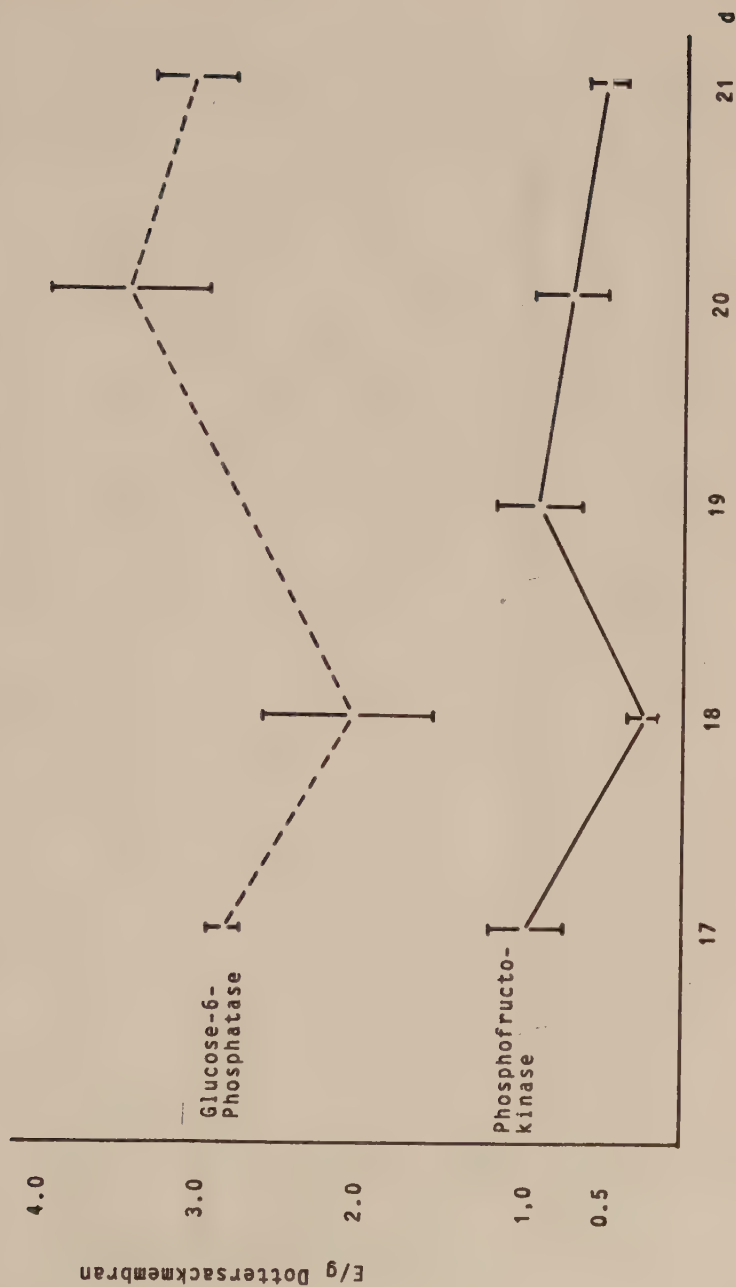
2.2.6. Einfluß des Calciummangels auf die Glykogenolyse

Da bei der Auslösung der Glykogenolyse auch den Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Funktion zukommt, wurde der Glykogenabbau unter calciumfreien Bedingungen studiert. Zu diesem Zweck wurde Leberhomogenat bzw. die Dottersackmembran in Phosphat-Puffer, dem zur Bindung der Ca^{2+} -Ionen 4 mMol EGTA zugegeben worden war, inkubiert. Die dabei erhaltenen Werte sind in Tab. 6 wiedergegeben. Demnach erniedrigt die Bindung der Ca^{2+} -Ionen die glykogenolytische Aktivität. Sie ist in der homogenisierten Leber im calciumfreien

Abb. 4
Aktivität der Phosphofructokinase und Glucose-6-Phosphatase
in der embryonalen Leber



Aktivität der Phosphofructokinase und Glucose-6-Phosphatase
in der Dottersackmembran



Tab 5

Aktivität der Phosphofructokinase unter dem Einfluß von ATP und AMP

	E/g Leber	
	Kontrolle	ATP AMP
Embryonal (17-19 d)	0.084 ± 0.018	$0.047 \pm 0.016^{***}$ $0.140 \pm 0.030^{***}$
n	(6)	(6) (6)
Neonatal (2 + 3 d)	3.100 ± 0.73	$2.120 \pm 0.49^*$ $4.280 \pm 0.77^*$
n	(7)	(7) (7)

d = Anzahl der Tage

n = Anzahl der Versuche

Konzentration d. Adenosinphosphate: 5mMol/ml

* $p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrolle*** $p < 0.001$

Tab. 6

Einfluß des Ca^{2+} -Mangels auf die Glucosebildung

	Krebs-Puffer	Krebs-Puffer +EGTA	Phosphat-Puffer	Phosphat-Puffer +EGTA
Zunahme der Glucose in $\mu\text{Mol/g}$ Gewebe				
Leberzellen (17 - 19 d)	$1.48 \pm 0.48^+$	0.94 ± 0.27		
n	(8)	(8)		
Leberhomogenat (17 - 19 d)	$6.39 \pm 1.57^{**}$		$29.18 \pm 5.61^{***}$	13.34 ± 2.17
n	(6)		(6)	(6)
Leberhomogenat (2 + 3 d)	$3.21 \pm 0.96^{***}$		$35.91 \pm 9.52^{**}$	20.32 ± 5.44
n	(9)		(9)	(6)
Dottersack (17 - 19 d)	4.21 ± 2.01	2.75 ± 1.37	$9.12 \pm 3.98^*$	4.78 ± 2.19
n	(6)	(6)	(6)	(6)

d = Anzahl der Tage

n = Anzahl der Versuche

Konzentration von EGTA: 4mMol/ml

*

p < 0.05

**

p < 0.01

p < 0.001

+

p < 0.05

Vergleich mit Phosphat-Puffer + EGTA

Vergleich mit Krebs-Puffer + EGTA

Phosphat-Puffer immer noch höher als in den Fällen, in denen das Leberhomogenat mit Krebs-Puffer inkubiert wurde. Im Dottersack jedoch entsprechen die Werte im calciumfreien Phosphat-Puffer denen des Krebs-Puffers.

2.2.7. Zusammenhang zwischen Glykogenolyse und Harnsäurebildung

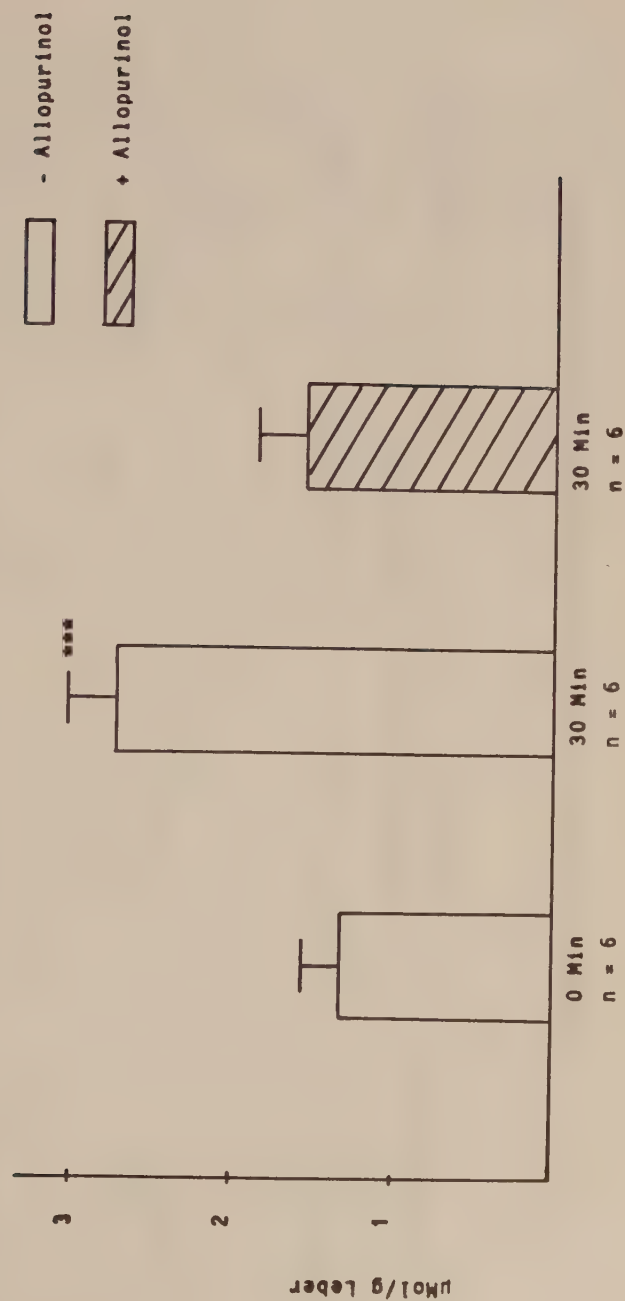
Wie im allgemeinen Teil erwähnt wurde, ist beim Huhn der Glucosestoffwechsel mit der Harnsäurebildung korreliert. Es stellt sich die Frage, ob sich dieser Zusammenhang auch im Glykogenstoffwechsel aufzeigen läßt. Für diese Fragestellung ist die Endphase der Embryogenese eine besonders interessante Entwicklungsstufe, und zwar einmal wegen der gesteigerten Glykogenolyse und der zunehmenden Xanthindehydrogenase-Aktivität in dieser Phase. Wie Abb. 6 zeigt, erhöht sich auch in der homogenisierten Leber die Harnsäure im Verlauf der Inkubation. Dieser Prozeß kann durch Allopurinol, einem Hemmer der Xanthindehydrogenase, weitgehend unterdrückt werden.

Einen ähnlichen Effekt zeigt auch Allopurinol auf die Glykogenolyse: Die durch ATP ausgelöste Steigerung der Glykogenolyse wird ebenfalls durch Allopurinol wieder gehemmt (Tab. 8). Auffallend dabei ist, daß die Abnahme der Glucose in der neonatalen Phase wesentlich geringer ausfällt als in der pränatalen Phase.

Um diesen Zusammenhang zwischen Glykogenolyse und Harnsäurebildung *in vivo* zu überprüfen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Embryonen am 17. Tag mit Dexamethason behandelt.

Abb. 6

Harnsäurebildung im embryonalen Leberhomogenat



*** $p < 0.001$

Tab. 8

Wirkung von Allopurinol auf die Glucosebildung im Leberhomogenat

	Kontrolle	ATP	ATP + Allopurinol
	Zunahme der Glucose in $\mu\text{Mol/g}$ Leber		
Embryonal (17 - 19 d)	$6.99 \pm 2.23^{***}$	46.83 ± 4.73	$17.83 \pm 3.19^{***}$
n	(6)	(6)	(6)
Neonatal (2 + 3 d)	$3.21 \pm 0.96^{***}$	57.08 ± 2.99	$47.32 \pm 2.08^{***}$
n	(9)	(6)	(6)

d = Anzahl der Tage

n = Anzahl der Versuche

Konzentration von ATP: 5mMol/ml *** $p < 0.001$ im Vergleich zu ATPKonzentration von Allopurinol: 10 mMol/l

Wie Abb. 7 zeigt, führte diese Behandlung einerseits zu einer Zunahme von Glucose in der Leber. Diese Zunahme ließ sich jedoch nur am 18. Tag statistisch sichern. Andererseits erhöhte sich unter dem Einfluß von Dexamethason die Aktivität der Xanthindehydrogenase (Abb. 8 a).

Schließlich erniedrigte sich unter dem Einfluß von Dexamethason die Aktivität der Phosphofructokinase (Abb. 8 b).

Abb.7 Einfluß von Dexamethason auf den Glucose- und Glykogengehalt in der Leber

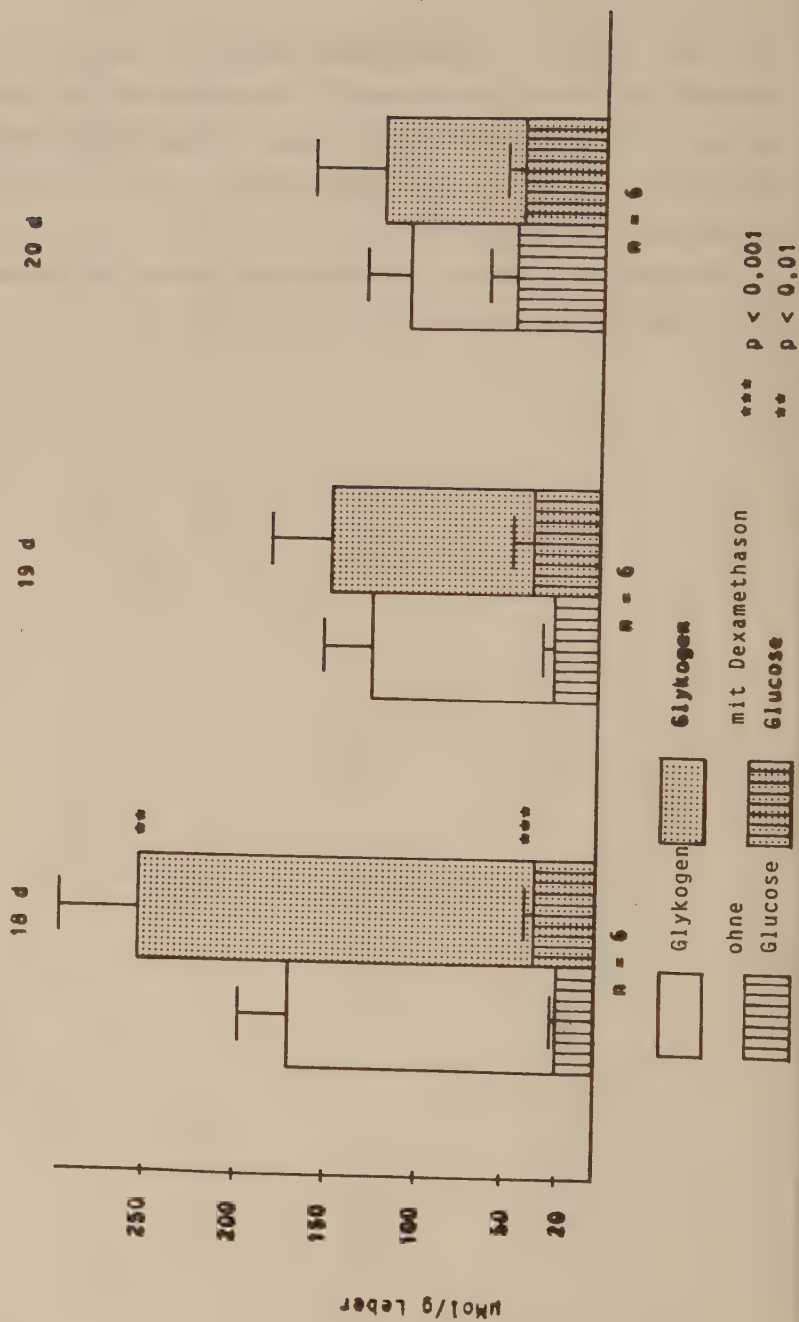
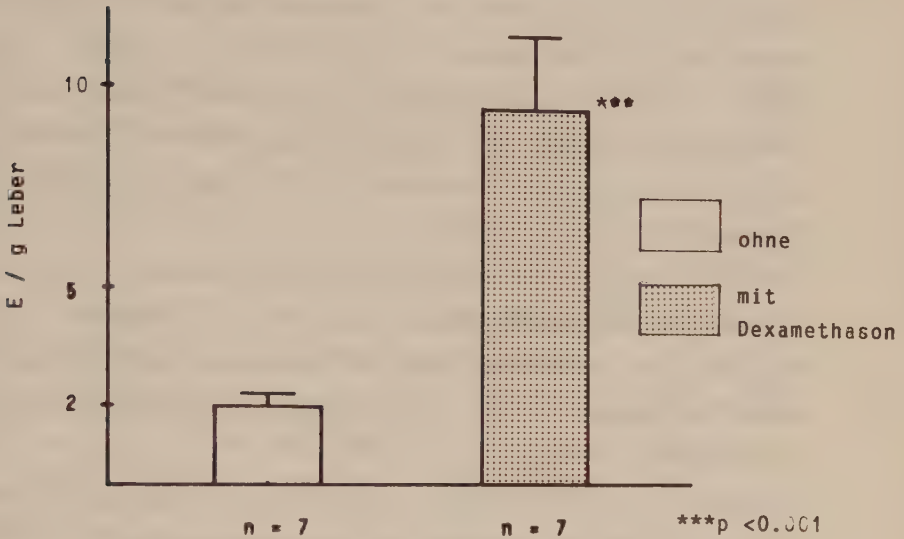
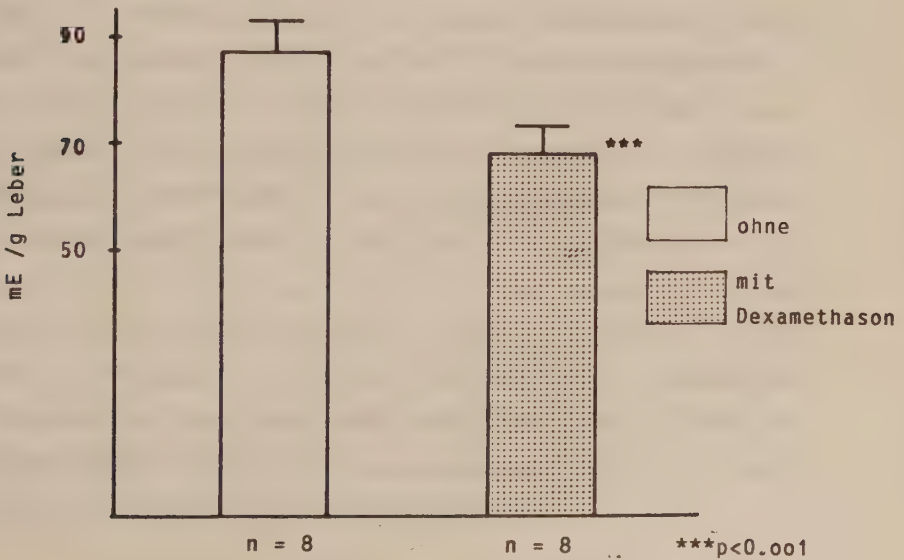


Abb. 8 Einfluß von Dexamethason in der embryonalen Kükenleber

a) auf die Xanthindehydrogenase



b) auf die Phosphofructokinase



3. Diskussion

=====

Obgleich über den Ablauf der Glykogenolyse und Glykolyse seit langem ein gut fundiertes Stoffwechselschema existiert, ist die Frage, welche Faktoren den Glykogenabbau gegen Ende der Inkubation einleiten, bis heute nicht befriedigend geklärt. Lange Zeit wurde die Meinung vertreten, daß Glucagon die Glykogenolyse auslöst (13, 56).

Abgesehen davon, daß vom Glucagon keine besondere Funktion im perinatalen Geschehen bekannt ist, ist zu bedenken, daß die Glykogenolyse beim Vogel nicht mit einem Anstieg von cAMP, dem second messenger, über den Glucagon seine Wirkung entfaltet, einhergeht.

Wittmann et al. (56) favorisieren daher einen anderen Mechanismus, nämlich die Auslösung des Glykogen-Abbaues durch Hypoxie. Daß das Schlupfgeschehen sich unter einem hypoxischen Zustand vollzieht, kann als gesichert angesehen werden. Darauf weist einmal die gegen den Schlupf zu voranschreitende Verringerung des O_2 -Gehaltes im Blut hin (14, 45). Zum anderen konnte gezeigt werden, daß eine vorzeitige Ausbildung die Hypoxie im Bereich der Luftkammer zu einem vorzeitigen Anpicken der Eischale führt (46, 53). Schließlich läßt sich an Hand der Gasaustauschkapazität der Eischale zeigen, daß die durch die Eischale eingetauschte O_2 -Menge nur für die Deckung des Grundumsatzes ausreicht. Erhöht sich der O_2 -Verbrauch durch die Steigerung der Bewegungsaktivität, die der Embryo zum Schlupf aus dem Ei einsetzt, so hält damit der O_2 -Eintausch nicht mehr Schritt; es kommt zu einer O_2 -Unterversorgung. Dies läßt sich am abfallenden

O_2 -Gehalt in der Luftkammer verfolgen, aus der der Embryo das O_2 über die Lungenatmung aufnimmt, die in dieser Entwicklungsphase einsetzt (29, 53, 54, 57).

Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, induziert ein Sauerstoffmangel entweder über den Konzentrationsanstieg von AMP oder PO_4^{3-} -Ionen den Glykogenabbau.

Die Zufuhr von AMP in dieser Arbeit führte allerdings nicht zu einem Anstieg der Glucose in der Leber. Auch die Glykolyse scheint durch AMP nicht gesteigert zu werden. Zumindest ergeben sich hierfür aus den Lactatwerten keine Hinweise.

Dies ist zunächst überraschend, da die Versuche zeigten, daß bei Zugabe von AMP sich die Aktivität der Phosphofructokinase, ein Schrittmacherenzym der Glykolyse, unter diesen Bedingungen tatsächlich erhöht.

Es wäre zwar denkbar, daß der Lactatspiegel den Glucoseumsatz nicht entsprechend widerspiegelt. Andererseits ist zu bedenken, daß, wie oben erwähnt wurde, die Abnahme des Glykogengehaltes der Zunahme der Glucose annähernd entspricht, so daß auch aufgrund dieser Bilanz nicht mit einem umfangreichen Glucoseabbau zu rechnen ist. Möglicherweise kommt der oben genannte Anstieg der Phosphofructokinase-Aktivität bei der dominierenden Aktivität der Glucose-6-Phosphatase nicht zum Tragen.

Insgesamt ergeben sich also aus den Werten dieser Arbeit keine Hinweise, daß unter in vitro-Bedingungen AMP den Glykogen- und Glucosestoffwechsel stimuliert. Es bleiben somit die PO_4^{3-} -Ionen als mögliche Stimulatoren der Glykogenolyse.

In der Tat zeigen die Befunde dieser Arbeit, daß unter dem Einfluß einer gesteigerten PO_4^{3-} -Ionen-Konzentration die Glykogenolyse zunimmt. Als wirksamer Mechanismus muß dabei eine Inaktivierung der Phosphatase angesehen werden. Diese Vorstellung paßt auch in das Schema, das GORIS und MERLEVEDE (17) der Auslösung der Glykogenolyse beim Hühnerembryo zugrunde legen. Nach ihren Befunden kommt die Zunahme der Glykogen-Phosphorylase gegen Ende der Inkubation durch eine Inaktivierung der Phosphatase zustande.

Ähnlich wie PO_4^{3-} -Ionen hatten auch ATP und ADP eine Steigerung der Glykogenolyse zur Folge. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die Substanzen als solche den glykogenolytischen Effekt direkt auslösten, da, wie am Beispiel von ATP gezeigt wurde, die Substanz in der homogenisierten Leber sehr rasch umgesetzt wird. Außerdem wäre vor allem von ATP eher eine Stimulierung der Glykogenese und nicht der Glykogenolyse zu erwarten gewesen.

Insgesamt dürfte demnach die Aktivierung der Glykogenolyse durch ATP und auch durch ADP durch die beim Abbau dieser Metaboliten frei werdenden PO_4^{3-} -Ionen zustande kommen. Dabei ist zu bedenken, daß es der Aktivierung nur in kleiner physiologischer Zunahme der PO_4^{3-} -Konzentrationen bedarf. Die Steigerung der Glykogenolyse durch den Phosphat-Puffer gegenüber dem Krebs-Puffer wurde bei 2,5 millimolarer PO_4^{3-} -Ionen-Konzentration ausgelöst. Bedenkt man, daß der Krebs-Puffer bereits eine 1,5 millimolare PO_4^{3-} -Ionen-Konzentration aufwies, so führt offensichtlich eine Steigerung um 1 mMol zu einem deutlichen Ansteigen der Glykogenolyse. Ein derartiger PO_4^{3-} -Anstieg ist bei der Zugabe von 5 mMol ATP und auch bei 5 mMol ADP mindestens zu erwarten.

Auffallend bei den Ergebnissen ist jedoch, daß ATP im Krebs-Puffer im Vergleich zum Phosphat-Puffer eine wesentlich größere Glykogenolyserate auslöste. Aufgrund dieses Befundes stellt sich die Frage, ob über die Phosphat-Ionen hinaus noch ein zusätzlicher ATP-Effekt sich ausbildet. In diesem Zusammenhang wäre schließlich auch zu klären, ob sich der Unterschied aufgrund einer unterschiedlichen Phosphat-Ionen-Konzentration ausbildete, wobei aufgrund der hohen ATP-Konzentration (5 mMol) im Krebs-Puffer sich dort auch die höhere Phosphat-Ionen-Konzentration einstellen könnte. Freilich ist dem entgegen zu halten, daß die Kombination von ATP und Phosphat-Puffer nicht zu einer Steigerung, sondern eher zu einer Verringerung der Glykogenolyse führt.

AMP liefert offensichtlich nicht die erforderlichen PO_4^{3-} -Ionen, um eine Glykogenolyse nach dem aufgezeigten Mechanismus auszulösen. Dies mag einmal an dem niedrigeren PO_4^{3-} -Gehalt dieses Adenosinphosphats im Vergleich zu ATP und ADP liegen. Zum anderen hat man schließlich zu bedenken, daß anders als bei ATP und ADP, AMP auch zu IMP umgesetzt wird, einer Reaktion, bei der keine PO_4^{3-} -Ionen frei werden.

Damit stellt sich die Frage, inwieweit auch unter in vivo-Bedingungen der geschilderte Mechanismus an der Auslösung der Glykogenolyse beteiligt sein könnte.

Aus Befunden in der Literatur ist bekannt (56), daß beim Vogelembryo dem Abfall des Glykogens ein Abfall des ATP-Gehaltes vorausgeht. Dabei erniedrigt sich der ATP-Gehalt um annähernd 1 mMol. Auch die Werte dieser Arbeit deuten auf einen ATP-Abfall

gegen den Schlupf zu hin. Man kann daher davon ausgehen, daß bei der ATP-Metabolisierung PO_4^{3-} -Ionen im Bereich von 1-2 mMol/g Leber freigesetzt werden, die nach den oben gezeigten Befunden für eine Stimulierung der Glykogenolyse ausreichen.

Der Befund, wonach die Zugabe von AMP in vitro keine Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel zur Folge hat, schließt allerdings nicht aus, daß AMP in vivo eine Wirkung entfaltet.

Da aber unter in vivo-Bedingungen keine AMP-Steigerung um diese Zeit der Entwicklung zu registrieren ist (56), kommt in vivo dieser Mechanismus bei der Auslösung des Glykogenabbaues nicht in Frage.

Offensichtlich wird das beim ATP-Abbau anfallende AMP wieder weiter abgebaut. Ein rascher AMP-Umsatz könnte auch die Ursache dafür bilden, daß wie zuvor ausgeführt wurde, AMP unter in vitro-Bedingungen die Glykogenolyse nicht forciert.

Aufgrund der dargelegten Verhältnisse muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß beim Vogelembryo der Limitierung in der O_2 -Versorgung gegen den Schlupf zu, eine wichtige Funktion bei der Auslösung der Glykogenolyse zukommt.

Damit ergäbe sich gleichzeitig ein sinnvoller Zusammenhang zwischen dem Energiestoffwechsel und der Glykogenolyse. Der O_2 -Mangel führt zu einem Abfall in der ATP-Bildung, das dabei freiwerdende PO_4^{3-} hemmt die Phosphatase und führt dadurch zu einer Aktivierung der Phosphorylase und somit zur Glykogenolyse.

Geht man schließlich davon aus, daß mit dem Einsetzen der Lungenatmung der intraovale O_2 -Verbrauch signifikant ansteigt und damit die Hypoxie verstärkt wird, so ist in der Einleitung der Lungenatmung ein wichtiges Regulans im Glykogenabbau zu sehen.

Ähnlich wie in der Leber vollzog sich auch im Dottersack die Abnahme des Glykogens zusammen mit einer Zunahme von Glucose und Lactat, wobei auch hier die Glucose im Vergleich zum Lactat der bestimmende Metabolit war. Offensichtlich wird hier ebenso die Glykogenolyse durch PO_4^{3-} -Ionen aktiviert. Auffallend ist lediglich, daß im Vergleich zur Leber im Dottersack der Lactat-Spiegel im Phosphat-Puffer niedrigere Werte erreichte als im Krebs-Puffer. Außerdem fällt auf, daß der Glucose- und Lactatanfall den Glykogenabbau nicht mehr so befriedigend widerspiegelt, wie es in der Leber der Fall ist. Eine Erklärung dieses Phänomens ist mit dem bisherigen Datenmaterial nicht möglich. Möglicherweise zeichnet sich die Dottersackmembran durch eine höhere glykolytische Aktivität aus. Diese Frage wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr untersucht. Es wurde lediglich gezeigt, daß die glykolytische Aktivität unter anoxischen Bedingungen zunimmt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß in isolierten Leberzellen mehr Glucose gebildet wurde, als aus den Glykogenvorräten abgebaut wurde. Hierbei ist zu beachten, daß Leberzellen im Gegensatz zum Leberhomogenat ihre gluconeogenetische Kapazität beibehalten. Es ist daher die Vermutung naheliegend, daß sich bei den Leberzellen während der Inkubation Glucose auch über die Gluconeogenese gebildet hat. Wie im allgemeinen Teil bereits ausgeführt wurde, ist die Freisetzung der Glucose vor allem dann gewährleistet, wenn die Glucose-6-Phosphatase eine relativ hohe Aktivität aufweist.

Wie die Befunde dieser Arbeit zeigten, ist dies gegenüber der Phosphofructokinase auch der Fall.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde schließlich untersucht, inwieweit die Glykogenolyse mit der Harnsäurebildung korreliert. Den Stimulus für diese Untersuchungen bildete der Befund, daß beim erwachsenen Huhn ein Zusammenhang zwischen Gluconeogenese und Harnsäurebildung besteht. Eine weiterreichende Koordinierung des Harnsäurestoffwechsels mit den Glykogenstoffwechsel erschien wegen der engen Beziehung zwischen Glucose- und Glykogenstoffwechsel durchaus möglich. Dies konnte experimentell auch tatsächlich gezeigt werden. In in vitro-Untersuchungen führte die Zugabe von Allopurinol, das die Harnsäurebildung auf der Stufe der Xanthindehydrogenase hemmt, zu einem deutlichen Abfall der Glykogenolyse. Weiterhin zeigten dann in vivo-Studien, daß die Aktivierung der Xanthindehydrogenase mit einer leichten Zunahme von Glucose und Glykogen einhergeht. Wie im allgemeinen Teil ausgeführt worden ist, geht man in der Literatur (11) davon aus, daß die Interaktion zwischen Gluconeogenese und Harnsäurebildung durch die Bereitstellung des Kohlenstoffgerüsts für die Purinsynthese zustande kommt. Daß unter dem Einfluß von Dexamethason die Gluconeogenese in der Leber aktiviert wurde, dafür spricht der erhöhte Glucosegehalt der Leber, der offensichtlich gleichzeitig zu einer Steigerung des Glykogens führt. Auch die Abnahme der Phosphofructokinase-Aktivität deutet auf eine gesteigerte Gluconeogenese hin. Andererseits ermöglicht die gesteigerte Xanthindehydrogenase-Aktivität eine erhöhte Harnsäurebildung. Es bleibt zu klären, inwieweit diese vermehrte Harnsäurebildung auf eine gesteigerte Synthese des

Purinringes zurückzuführen ist. Denkbar wäre jedoch auch, daß die verstärkte Harnsäurebildung, die mit der Zunahme der Xanthindehydrogenase-Aktivität zu erwarten ist, die Gluconeogenese positiv beeinflußt. Da die Bildung der Harnsäure zu einer Steigerung der cytoplasmatischen Reduktionsäquivalente (NADH) führt und die verfügbaren Reduktionsäquivalente die Gluconeogenese beim Huhn limitieren (30, 37), ist eine Steigerung der Gluconeogenese bei vermehrter Harnsäurebildung durchaus möglich. Demnach würde der Purinstoffwechsel die Gluconeogenese stimulieren und nicht umgekehrt.

Legt man zur Klärung der Koordination zwischen Glucose- und Harnsäurestoffwechsel das oben aufgezeigte Schema zugrunde, so überrascht, daß bei Versuchen in-vitro durch Hemmung der Xanthindehydrogenase durch Allopurinol gleichzeitig eine Abnahme der Glykogenolyse eintrat. Ein derartiger Zusammenhang existiert beim Hühnerembryo aber offensichtlich auch in vivo nicht. Die Auslösung der Glykogenolyse findet nämlich um den 18./19. Tag statt, während die Xanthindehydrogenase-Aktivität der Leber erst beim Eintritt in die neonatale Phase deutlich ansteigt.

4. Zusammenfassung

=====

In der vorliegenden Arbeit wurde der Glykogenstoffwechsel um die Zeit des Schlupfes in der embryonalen Hühnerleber und in der Dottersackmembran untersucht.

Dabei zeigte sich, daß ATP, ADP und PO_4^{3-} -Ionen einen stimulierenden Einfluß auf die Glykogenolyse ausüben, während mit AMP kein Effekt erzielt werden konnte. Die Glykogenolyse geht mit einer Zunahme von Glucose und Lactat einher. Die Glykogenolyserate in der Leber entspricht annähernd der Glucose- und Lactatzunahme, während in der Dottersackmembran die Glykogenabnahme die Zunahme von Glucose und Lactat deutlich übersteigt. Da exogenes ATP schon nach 10 Minuten abgebaut war, liegt die Vermutung nahe, daß ATP und ADP ihre stimulierende Wirkung auf die Glykogenolyse durch PO_4^{3-} -Ionen ausüben.

Aufgrund dieser Befunde ergibt sich für die Einleitung der Glykogenolyse folgender Mechanismus: Ein hypoxischer Zustand, der bekanntlich gegen den Schlupf zu entsteht, führt zu einer Abnahme energiereicher Adenosinphosphate. Die dabei freigesetzten PO_4^{3-} -Ionen lösen den Glykogenabbau dadurch aus, daß sie die Glykogen-Phosphatase hemmen und somit die Glykogen-Phosphorylase aktivieren.

Außerdem wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Glykogenolyse und der Harnsäuresynthese besteht. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß bei einer Hemmung der Xanthindehydrogenase gleichzeitig ein Abfall im Glykogenabbau zu beobachten ist. Außerdem stimulierte Dexamethason in vivo in einer Konzentration von 125 mg/Ei sowohl die Aktivität der

Xanthindehydrogenase in der Leber als auch die Bildung von Glucose und Glykogen in diesem Organ. Offensichtlich beruht die Zunahme von Glykogen auf einer gesteigerten Gluconeogenese, an der allem Anschein nach auch der Harnsäurestoffwechsel beteiligt ist. Da die Zunahme der Xanthindehydrogenase-Aktivität nicht mit der Auslösung der Glykogenolyse koordiniert ist, erfolgt die Auslösung der Glykogenolyse in vivo nicht über den Harnsäurestoffwechsel.

SUMMARY

=====

On the metabolism of glycogen in liver and yolk sac of the
embryonic chick

In the work presented here, the metabolism of glycogen has been investigated in the liver and yolk sac membrane of the embryonic chick at the end of incubation.

ATP, ADP and PO_4^{3-} -ions exert a stimulating influence on glycogenolysis whereas no effect was recorded with AMP. The degradation of glycogen is accompanied by an increase in glucose and lactate. In liver the increase in glucose and lactate corresponded approximately to the amount of the degraded glycogen whereas in the yolk sac membrane the amount of degraded glycogen was higher than the amount of glucose and lactate formed under these circumstances.

Since exogenous ATP was degraded in homogenized liver within 10 minutes, it seems very likely that ATP and ADP exerted their stimulatory effect on glycogenolysis via PO_4^{3-} -ions.

On the basis of these results glycogen degradation in chick embryos may be released by the following mechanism. A hypoxic status which is known to be formed towards the end of incubation leads to a decrease of energetic adenine-nucleotides and the PO_4^{3-} -ions released in this way may trigger the cascade of glycogen degradation by inhibiting the glycogen-phosphatase which finally causes an activation of glycogen-phosphorylase.

Furthermore experiments dealing with the interaction of uric acid synthesis and glycogenolysis were undertaken. It has been demonstrated, that in vitro an inhibition of xanthin-dehydrogenase is followed by an inhibition of glycogenolysis. In addition, dexamethason (125 mg per egg) stimulated both, the activation of XDH and the increase of glucose and glycogen in liver. Obviously, the augmentation of glycogen is based on the activated gluconeogenesis, which itself may be supported by the process of uric acid synthesis. However, the release of glycogenolysis in vivo is not triggered by uric acid metabolism, as the increase of XDH activity is not correlated with the onset of glycogenolysis.

5. Literaturverzeichnis

=====

1. Allen H. J., 1919
Glycogen in the chick embryo
Biol. Bull. 36, 63 - 70
2. Baginski E. S., Foa P. P., Zak B., 1970
In: Methoden d. enzymatischen Analyse, Bergmeyer H. U.,
Verlag Chemie, 839 - 843
3. Ballard F. J. and Oliver T., 1963
Glycogenmetabolism in embryonic chick and neonatal rat liver
Biochem. Biosphys. Acta 71, 578 - 588
4. Bergmeyer H. U., Bernt E., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H. U.
Verlag Chemie, 533 - 537
5. Bergmeyer H. U., Bernt E., Schmidt F. and Stork H.
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H. U.
Verlag Chemie, 1163 - 1168
6. Brandt H., Capulong Z. L. and Lee E. Y. C., 1975
Purification and properties of rabbit liver phosphorylase
phosphatase. J. Biolog. Chem. 250, 8038 - 8044

7. Clark D. G., Rognstad R. and Katz J., 1974
Lipogenesis in rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. 249, 2028 - 2036
8. Devos P. and Hers H. G., 1974
Glycogen metabolism in the liver of the foetal rat.
Biochem. J. 140, 331 - 340
9. Exton J. H. and Harper S. C., 1975
Role of cyclic-AMP in the actions of catecholamines in hepatic carbohydrate metabolism.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 519 - 532
10. Fister P., Eigenbrodt E. and Schoner W., 1982
Inactivation of phosphofructokinase in chicken hepatocytes by epinephrine
Molec. Cell. Endocr. 26, 19 - 30
11. Fister P., Eigenbrodt E. und Schoner W., 1983
Simultaneous stimulation of uric acid synthesis and gluconeogenesis in chicken hepatocytes by -adrenergic action of epinephrine and calcium
FEBS letters Vol. 139, 27 - 31
12. Freeman B. M., 1968
The mobilization of hepatic glycogen in gallus domesticus at the end of incubation.
Comp. Biochem. Physiol., 1969, Vol. 28, 1169 - 1176

13. Freeman B. M., and Manning A. C., 1971
Glycogenolysis and lipolysis in *gallus domesticus* during the perinatal period.
Comp. Gen. Pharmac., 1971, 2. 198 - 204
14. Freeman B. M. and Mission B. H., 1970
PH, pO_2 and pCO_2 of blood from the fetus and neonate of *gallus domesticus*.
Comp. Biochem. Physiol. 33, 763 - 772
15. Gilbert M. and Bourbon J., 1978
Turnover of liver glycogen in rat foetus.
Biochem. J. 176, 785 - 789
16. Glinsmann W. H., Hern E. P., Lynch A., 1969
Intrinsic regulation of glucose output by rat liver.
Biochem. J. 119, 129 - 139
17. Goris J. and Merlevede W., 1969
Liver phosphorylase and its regulating enzymes during ontogenesis of the chick embryo.
Archives internationales de physiologie et de biochimie 1969, 77, 44 - 56
18. Greengard O. and Thorndike J., 1974
Changing enzyme patterns in chick organs during developement
Enzyme 17, 1974, 333 - 378

19. Hems D. A. and Brosnau J. T., 1970
Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo.
Biochem. J. 120, 105 - 111
20. Hems D. A., Rodrigues L. M. and Whitton P. D., 1978
Rapid stimulation by vasopressin, oxytocin and angiotensin II of glycogen degradation in hepatocyte suspensions
Biochem. J. 172, 311 - 317
21. Hue L., Bontemps F. and Hers G. H., 1975
The effect of glucose and potassium ions on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations
Biochem. J. 152, 105 - 114
22. Hutson N. J., Brumley F. T., Assimacopoulos F. D., Harper S. C., Exton J. H., 1976
Studies on the α -adrenergic activation of phosphorylase and gluconeogenesis and inactivation of glycogen synthetase in isolated rat liver parenchymal cells.
J. Biol. Chem. 251, 5200 - 5208
23. Jaworek D., Gruber W. and Bergmeyer H. U., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H. U.
Verlag Chemie, 471 - 472

24. Keppens S., Vandenheede J. R. and De Wulf H., 1977
On the role of calcium as second messenger in liver
for the hormonally induced activation of glycogen
phosphorylase.
Biochim. Biophys. Acta 496, 448 - 457
25. Keppler D. und Decker K., 1970
In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bergmeyer H.U.,
Verlag Chemie, 1089 - 1094
26. Khandelwal R. L., 1977
Some properties of purified phosphoprotein phosphatases
from rabbit liver.
Biochim. Biophys. Acta 485, 379 - 390
27. Kilsheimer G. S., Weber D. R. and Ashmore, 1960
Hepatic glucose production in developing chicken embryo
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 515 - 518
28. King J., 1970
In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bergmeyer H. U.,
Verlag Chemie, 614 - 616
29. Kovach J. K., 1970
Development and mechanisms of behavior in chick embryo
during the last five days of incubation.
J. Comp. Physiol. Psychol. 73, 392 - 406

30. Mapes J. P. and Krebs H. A., 1978
Rate limiting factors in urate synthesis and
gluconeogenesis in avian liver.
Biochem. J. 172, 193 - 203
31. Noll F., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H.U.
Verlag Chemie 471 - 472
32. Pointer R. H., Butcher F.R. and Fain J. N., 1976
Studies on the role of cyclic guanosine 3'-5'-mono-
phosphate and extracellular Ca^{2+} in the regulation
of glycogenolysis in rat liver cells.
J. Biol. Chem. 251, 2987 - 2992
33. Romanoff A. L., 1960
The avian embryo, Wiley, New York, 177 - 232
34. Scholz R. W. and Featherston W. R., 1968
Effect of alterations in protein intake on liver
xanthine dehydrogenase in the chick.
J. Nutr. 95, 272 - 280
35. Shama R. J., Rodrigues L. M. and Hems D. A., 1978
Activation of hepatic glycogen phosphorylase in
anoxic liver.
Biochem. Soc. Trans. 6, 1319 - 1321

36. Sherline P., Lynch A. and Glinsmann W. H., 1972
Cyclic AMP and adrenergic receptor control of rat
liver glycogen metabolism.
Endocrinology 91, 680 - 690
37. Söling H. D., Kleineke J., Wilms J., Janson G.
and Kulm A., 1973
Relationship between intracellular distribution of
PEPCK, regulation of gluconeogenesis and energy cost
of glucose formation.
Eur. J. Biochem. 37, 233 - 243
38. Spratt N. T. Jr., 1968
In: The chemical Basis of Development, McElroy W. B.
and Glass B., John Hopkin Press, Baltimore, Maryland 629
39. Stalmans W., 1976
The role of liver in the homeostasis of blood glucose.
Curr. Top. Cell Regul. 11, 31 - 97
40. Stalmans W., De Wulf H., Hue L. and Hers H. G., 1974
The sequential inactivation of glycogen phosphorylase
and activation of glycogen synthetase in liver after
the administration of glucose to mice and rats.
Eur. J. Biochem. 41, 127 - 134

41. Stalmans W., De Wulf H., Lederer B. and Hers H. G., 1975
The effect of glucose and of treatment by glucocorticoids
on the inactivation in vitro of liver glycogen phosphory-
lase.
Eur. J. Biochem. 15, 9 - 12
42. Stalmans W. and Hers H. G., 1975
The stimulation of liver phosphorylase b by AMP, fluoride
and sulfate: a technical note on the specific determination
of the a and b forms of liver glycogen phosphorylase.
Eur. J. Biochem. 54, 341 - 350
43. Stalmans W., Laloux M. and Hers H. G., 1974
The interaction of liver phosphorylase a with glucose
and AMP.
Eur. J. Biochem. 49, 415 - 427
44. Tan A. W. H. and Nuttall F. Q., 1975
Characteristics of the dephosphorylated form of phospho-
rylase purified from rat liver and measurement of this
activity in crude liver preparations.
Biochim. Biophys. Acta 410, 45 - 60
45. Tazawa H., Visschedijk A. H. J., Wittmann J. and
Piiper J., 1983
Gas exchange, blood gases and acid-base status in
the chick before, during and after hatching.
Respiration Physiology 53, 173 - 185

46. Visschedijk A. H. J., 1968
The air space and embryonic respiration. The pattern of gaseous exchange in the fertile egg during the closing stages of incubation.
Br. Poultry Sci. 9, 173 - 184
47. Wai Yiu Cheung, 1979
Calmodulin plays a pivotal role in cellular-regulation.
Science Vol. 207, 19 - 26
48. Walli A. K., Siebler G., Zepf E. and Schimassek H., 1974
Glycogen metabolism in isolated perfused rat liver.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 353 - 362
49. Wangensteen O. D. and Rahn H., 1970/71
Respiratory gas exchange by the avian embryo
Respir. Physiol. 11, 31 - 45
50. Wangensteen O. D., Wilson D. and Rahn H., 1970/71
Diffusion of gases across the shell of hen's egg.
Respir. Physiol. 11, 16 - 30
51. Watts C. and Gain K., 1976
Glycogen metabolism in the liver of the developing rat.
Biochem. J. 160, 263 - 270

52. Wittmann J., 1976

Über die Bestimmung der Adeninnukleotide in der Geflügel-leber.

Z. Versuchstierkunde, Bd. 18, 9 - 15

53. Wittmann J., Kugler W. and Petry H., 1982

Motility pattern and lung respiration of embryonic chicks under the influence of L-Thyroxine and Thiourea.

Comp. Biochem. Physiol. Vol. 75 A No. 3, 379 - 384

54. Wittmann J., Kugler W. and Rahn H., 1984

Lung respiration, somatic activity and gas metabolism in embryonic chicks prevented from hatching by thiourea.

Comp. Biochem. Physiol. 77 A, 547 - 551

55. Wittmann J., 1978

Der perinatale Stoffwechsel der Kükenleber und seine Beeinflußbarkeit. Habil. Schrift, Institut für Tierphysiologie des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München.

56. Wittmann J. and Weiss A., 1980

Studies on the metabolism of glycogen and adenine nucleotides in embryonic chick liver at the end of incubation.

Comp. Biochem. Physiol. Vol. 69 C, 1 - 6

57. Wittmann J. and Weissenbeck, 1981

The influence of gas composition in the air cell on pipping and liver metabolism in embryonic chicks.

Biochem. Exp. Biol.

58. Woods H. F. and Krebs H. A., 1971

Lactate production in the perfused rat liver.

Biochem. J. 119, 129 - 139

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

So danke ich dem geschäftsführenden Vorstand des Instituts, Herrn Prof. Dr. H. Zucker, für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Wittmann für die Überlassung des Themas, die vielen Anregungen und die geduldige Betreuung.

Frau B. Hofer danke ich für die unermüdliche Anleitung.

L e b e n s l a u f

Name : Manfred Schmidt
 Geboren: 31.5.1949 in 8802 Königshofen
 Eltern: Alfred Schmidt; Schreiner von Beruf
 Margarete Schmidt, geb. Zahm

Ausbildung und bisherige Tätigkeit

1955 - 1966	Volksschule in 4600 Dortmund Realschule - " - Realschule in 8430 Neumarkt
1966 - 1977	Ausbildung und anschließende Be- schäftigung bei der Bayer. Staats- forstverwaltung als Forstinspektor mit Unterbrechung durch Wehrdienst
1975 - 1978	Abendgymnasium in 8400 Regensburg mit Abschluß Allgemeine Hochschul- reife
1978 - 1979	Studium der Forstwissenschaft in München
1979 - 1984	Studium der Tiermedizin in München
seitdem	Arbeit an einer Dissertation am Institut für Tierphysiologie, Tierärztliche Tätigkeit als Assistent in der kurativen Praxis, Seminar für Tropenveterinärmedizin an der FU Berlin

... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..

... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

K — Druck
8400 Regensburg
Tel.: 0941 / 700 350